エンドトキシン簡便法講習

2015年4月24日
和光純薬工業株式会社

エンドトキシン簡便法　実習スケジュール

（講義）　9：35-10:50
◆エンドトキシン測定法の基礎
◆薬局方エンドトキシン試験
◆エンドトキシン簡便法と保存検量線
◆保存検量線作成方法と使用上の注意点

（デモと実習）　10:50-12:35
◆保存検量線作製方法のデモ
◆プロトコル（日常試験の実習）の説明
◆日常試験の実習

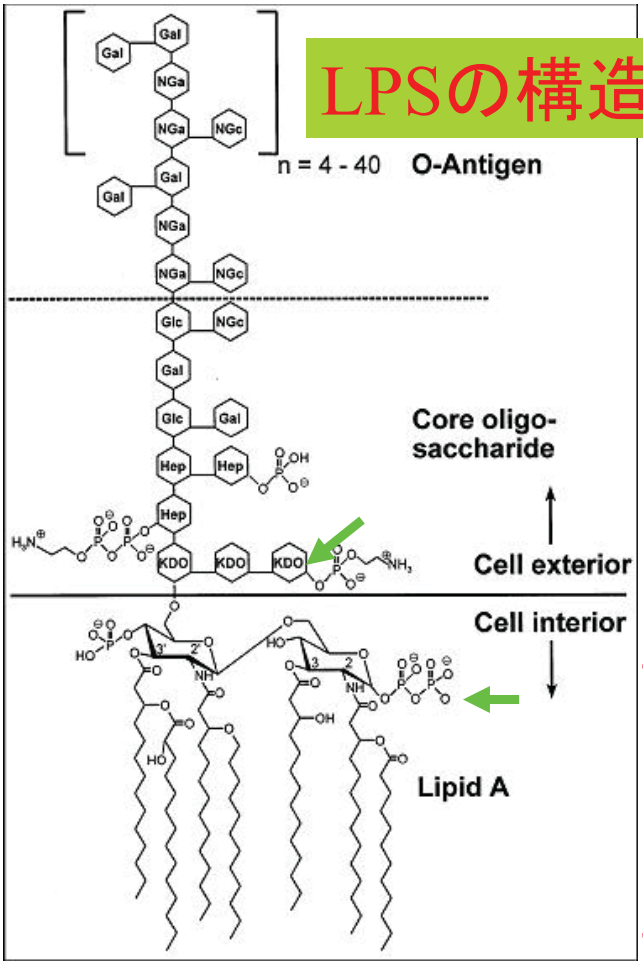
（講義）　13:35-13:55
◆トキシノメーターの適格性評価と点検項目

（まとめ）　13:55-14:10
◆測定結果の解説と評価（質疑応答）

エンドトキシン測定法の基礎

LPSの構造模式図

親水性



負電荷

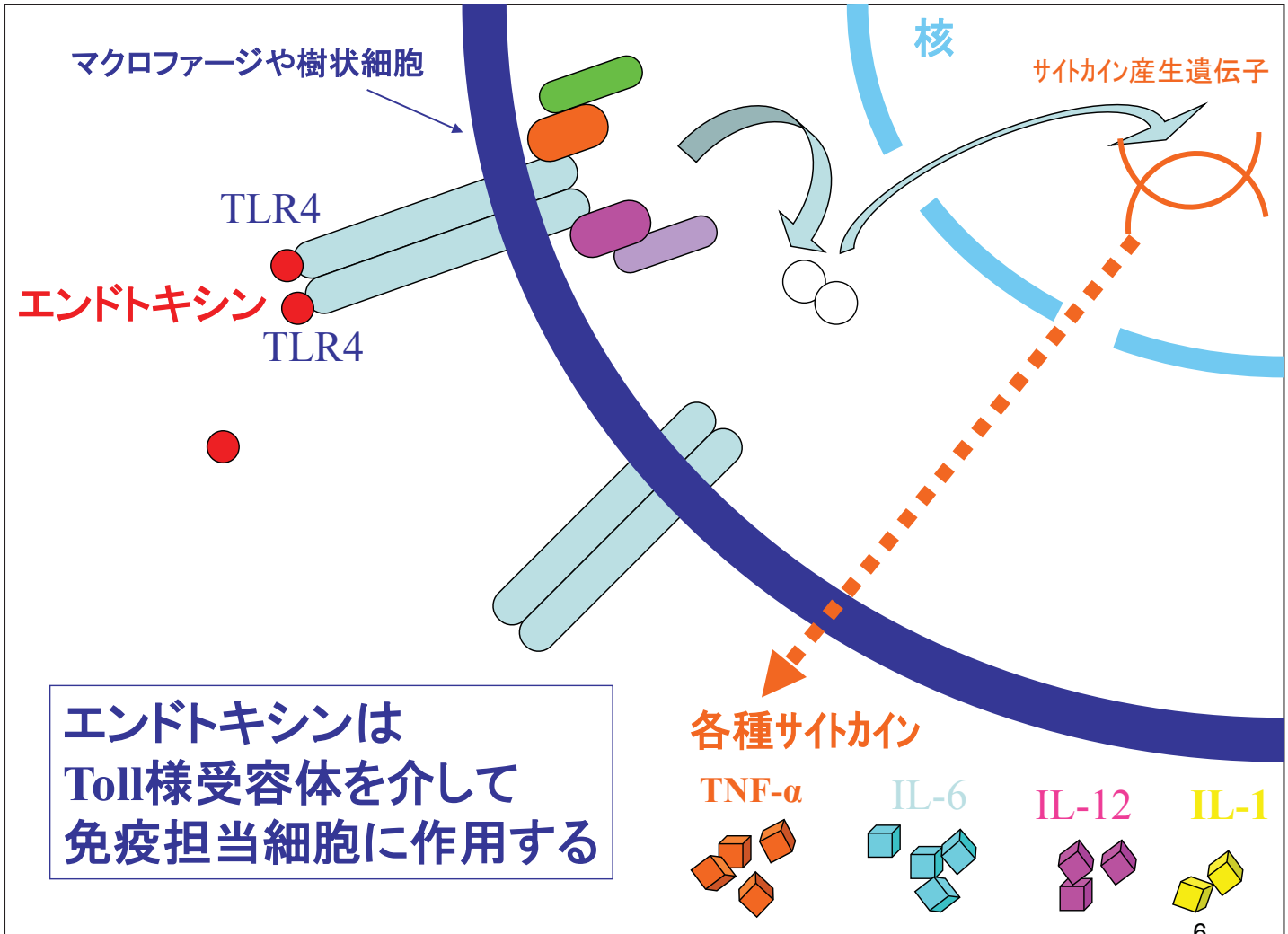
疎水性

分子量約2000

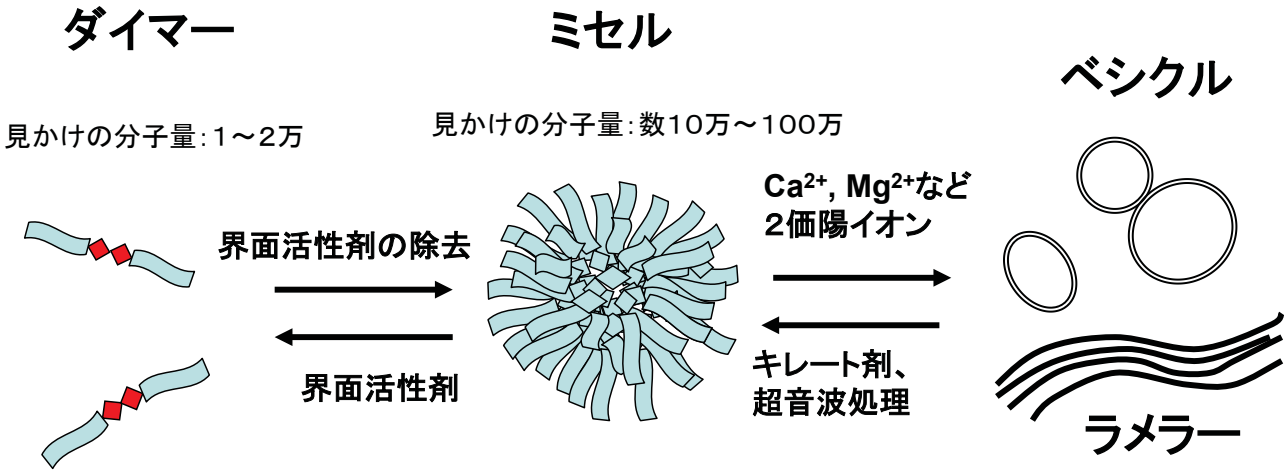
エンドトキシン(別名 LPS)の特徴

- 微量（ngやpg)で生物活性(発熱・免疫応答性)を示す。
- 耐熱性　(250℃ 30分以上の乾熱で失活する)
- あらゆるところに出現 (グラム陰性菌がいる、またはいた証拠)

注射剤などでは、エンドトキシン混入量を管理する必要がある



エンドトキシンの水溶液中での存在状態



高次構造の変化 → 生物活性の変化

従って、重量当たりの活性（発熱性）は変化する

薬局方エンドトキシン試験

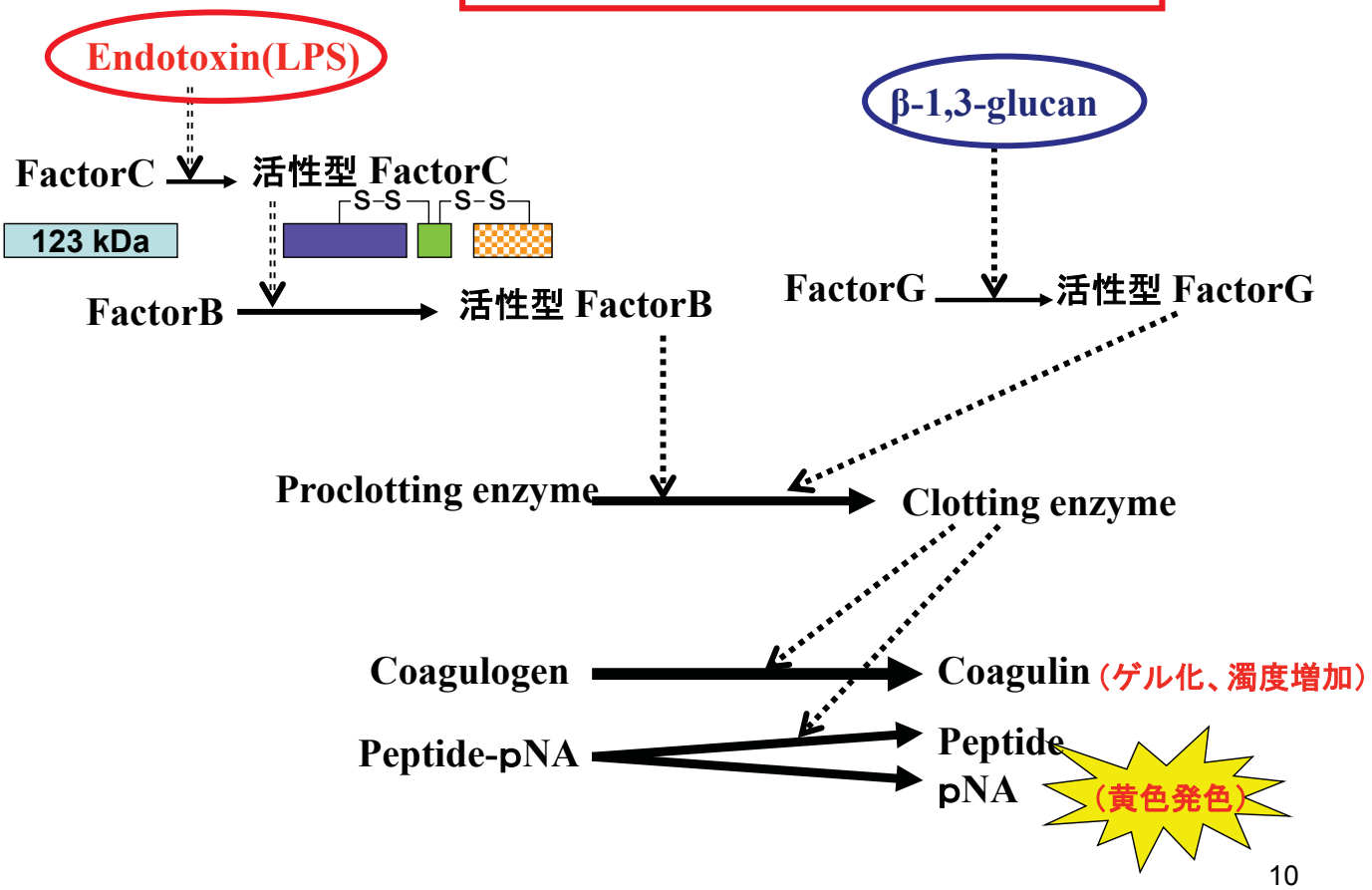
局方エンドトキシン試験法とは？

Bacterial Endotoxins Test (BET)

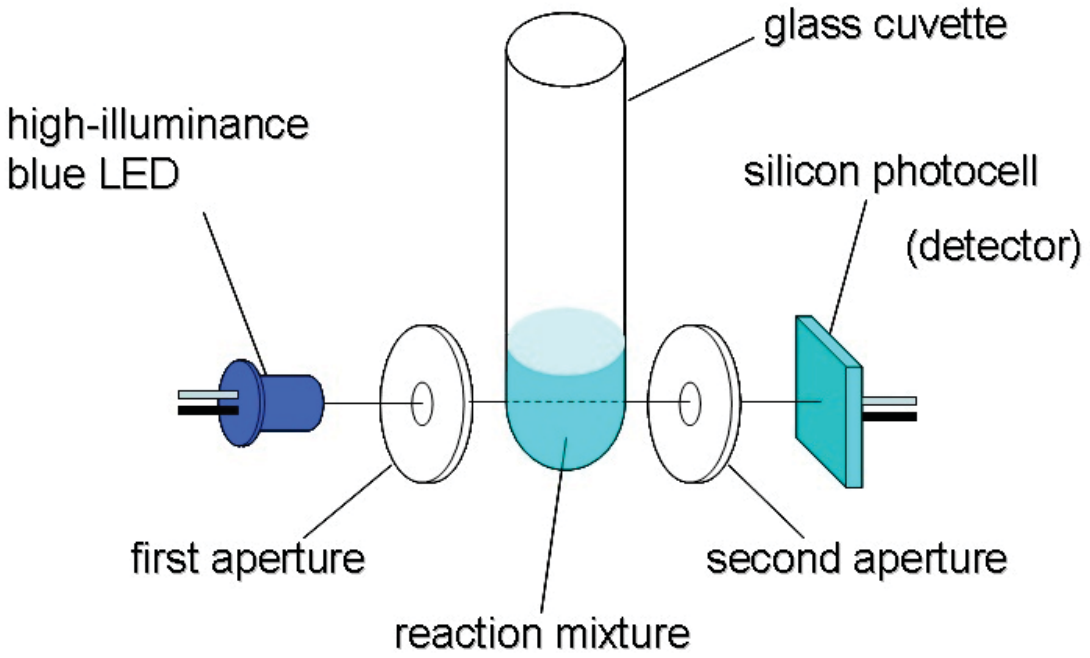
カブトガニの血液凝固系を利用した
「ライセート試薬」を用いて、
発熱性物質である「エンドトキシン」を検出する試験。

結果は、EU（Endotoxin Unit）で表示。

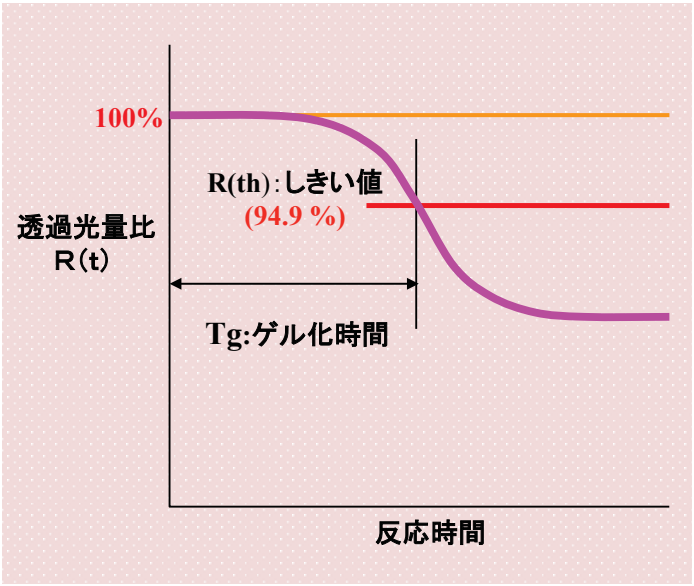
ライセート試薬の反応機構



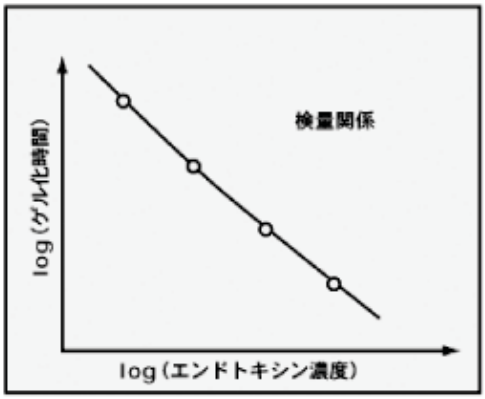
トキシノメーターの内部構造



トキシノメーター法の原理

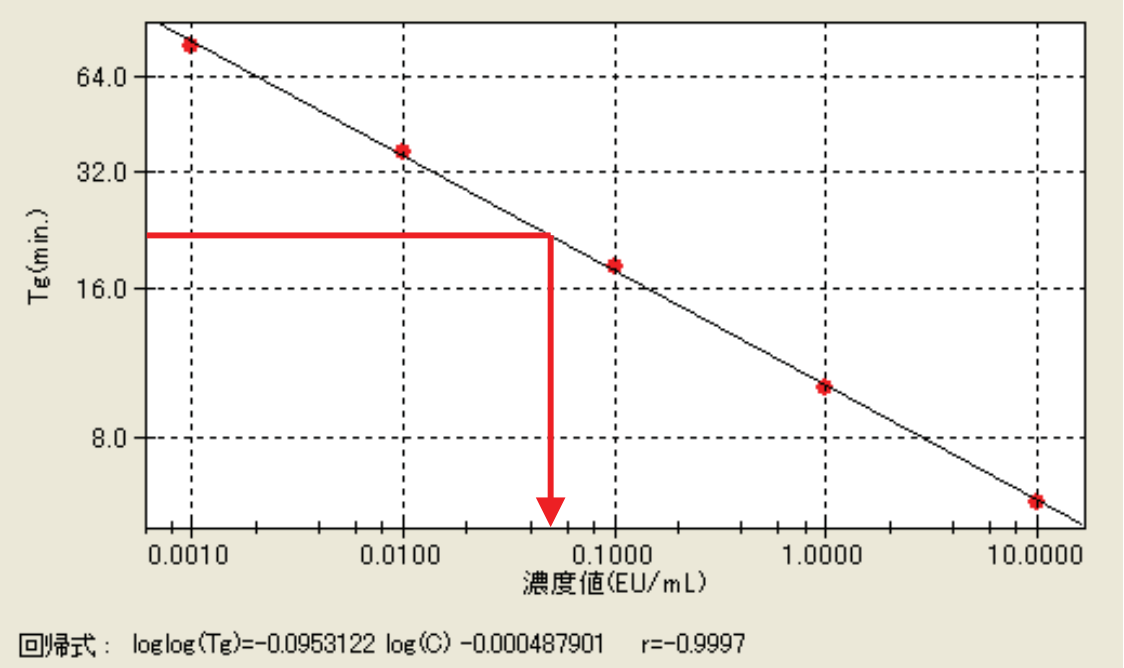


R(t)透過光量比　透過光量I(t)の反応初期の透過光量I0に対する割合
(I(t)/I0)×100(%)



エンドトキシン濃度とゲル化時間とは両対数プロットで上図のような検量関係を示します。

測定開始から、R(t)がR(th)になるまでの時間をゲル化時間Tgとして読み取る。



カイネティック-比濁法 PYROSTAR ES-FトキシノメーターET-6000を使用。

図　光学的定量法における検量線の例

局方エンドトキシン試験法における バリデーションの要件

ゲル化法では、
エンドポイントが0.5λ-2λ、
光学的定量法では、
検量線の相関係数の
絶対値が0.980以上

◆予備試験として

（1）エンドトキシン標準品を測定して、試験条件が適切であることを確認する。

試験条件とは→試薬の性能、使用器具、操作者の技術など

（2）エンドトキシン標準品を添加した試料を測定し、試料が測定に影響しないことを確認する。

影響した場合は試料を希釈するなどで影響を取り除く。
ただし希釈倍数はMVD以下とする。

ゲル化法では、
エンドポイントが0.5λ-2λ、
光学的定量法では、
添加エンドトキシンの
回収率が50-200%

◆日常試験として

（3）毎回、（1）と（2）を確認しながら測定する。

日本薬局方エンドトキシン試験法では・・

（光学的定量法の測定方法）

A液：試料溶液

B液：試料溶液に検量線の中点付近濃度になるようエンドトキシンを添加したもの（陽性薬剤対照）。

C液：検量線作成用エンドトキシン溶液(3濃度以上)

D液：エンドトキシン試験用水(陰性対照)

A～D液をｎ＝2以上の繰り返しで測定する(測定数は合計12本以上）。

（合格条件）

① C液で作成した検量線の相関係数の絶対値が0.980以上

② D液の測定結果が陰性

③ （B液の測定値－A液の測定値）÷B液に添加したエンドトキシン濃度×100が、50－200（%）にある

④ A液の測定値がエンドトキシン規格値(○○ EU/mL未満など)を満たす。

表3 カイネティック比濁法における硫酸マグネシウム注射液(500 mM)の反応干渉因子試験実施例
（リムルスHS-Jテストワコーとトキシノメーターを使用）

液	ｴﾝﾄﾞﾄｷｼﾝ添加濃度	硫酸マグネシウム濃度	ゲル化時間 (min)	ｴﾝﾄﾞﾄｷｼﾝ濃度 (EU/ml)	添加ｴﾝﾄﾞﾄｷｼﾝ回収率(%) ((B-A)/0.0625x100)
A	0	25 mM	>60 >60	O(<0.0047)	-
		50 mM	>60 >60	O(<0.0047)	-
		100 mM	>60 >60	O(<0.0047)	-
B	0.0625 EU/ml	25 mM	21.8 21.6	0.06632	106
		50 mM	23.6 23.2	0.05302	84.8
		100 mM	25.4 25.8	0.04087	65.4
C	0.0156 EU/ml	0	38.0 35.8 39.4	loglog (Tg) = −0.1081log(C)−0.0009951 r = −0.9939	
	0.0625 EU/ml		21.0 21.4 21.0		
	0.25 EU/ml		15.0 14.4 14.8		
D	0	0	>60 >60		

＊硫酸マグネシウム注射液 (500 mM = 123 mg/ml)のエンドトキシン規格値は0.09 EU/mgである。
MVD = (123 mg/ml x 0.09 EU/mg)/0.0156 = 709.6 倍

日常試験を実施する濃度は、回収率が75-125%を推奨

エンドトキシン簡便法の歴史

FDA Interim Guidance for Human and Veternary Drug Products and Biologicals　KINETIC LAL TECHNIQUES（1991年）
→局方が整備されるとともに役目を終えたため、 2011年に廃止。

（保存検量線使用についての記載）

- 保存検量線の作成方法
  連続した3日間、3濃度以上、 n = 3以上のエンドトキシン溶液を測定し、得られた全点を用いて作成する。
  検量線の相関係数の絶対値は0.980以上であること。
- 陽性対象（ＰＣ）による精度管理
  PC(検量線の中点濃度のエンドトキシン溶液)を毎回調製、試料と同時測定し、保存検量線を用いて濃度を算出した時、75-125%にあること。

エンドトキシン規格値 (Endotoxin Limit) 設定の考え方

（薬剤の）エンドトキシン濃度＜K値／ヒト最大投与量＊

＊体重1kg当たり1回の投与量

日本、米国、欧州薬局方で規定されたK値（発熱誘起エンドトキシン量）

投与経路	K値（EU/kg）
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2

日局の場合、
1回投与、1人あたり
2.5×60 ＝ 150EU未満

最大有効希釈倍数（MVD Maximum Valid Dilution）

通常、反応干渉因子を除くためには **試料を希釈する。**

最大何倍まで試料を希釈して測定してもよいか。

試料溶液の濃度の単位は規格値に揃えること！

$$MVD = \frac{\text{エンドトキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\text{用いる測定方法の最低検出可能濃度}*}$$

＊　ゲル化法では<u>ラベル表示感度</u>

光学的方法では<u>検量線の最小濃度</u>

エンドトキシン試験法の簡便化

（独）放射線医学総合研究所
分子イメージング研究センター

脇　厚生

脇　厚生先生よりご説明いただきます

日本薬局方がエンドトキシン試験法で規定している方法

➡ 局方が求める信頼性レベル

1．予備試験（あらかじめすべき検討）

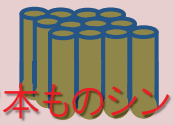
（1）ライセートロットごとの検量線の信頼性確認試験（r=0.980以上）
（2）反応干渉因子試験

2．本試験（毎日の試験）

（1）3濃度以上の検量線（n=2）を作成し、r=0.980以上
（2）反応干渉因子試験を実施し（n=2）、50-200%以内
（3）エンドトキシン試験用水（n=2）ではエンドトキシンは検出されない
（4）測定検体（n=2）

} 試験成立条件

エンドトキシン試験：データの信頼性と経済性

試験法	検量線	反応干渉因子試験	必要なライセート本数
日本薬局方準拠法 検量線：（3濃度 n=2） 検量線中点濃度+PET薬剤（n= 2） エンドトキシン試験用水（n= 2） PET薬剤（n= 2）	適格性確認 ○	○	 12本ものシングルテストが必要
多くのPET施設 実施方法 検量線：なし 検量線中点濃度+PET薬剤：なし エンドトキシン試験用水：なし PET薬剤（n= 2）	定量できない ✖	試験条件確認なし ✖	 2本で経済的だが信頼性不安

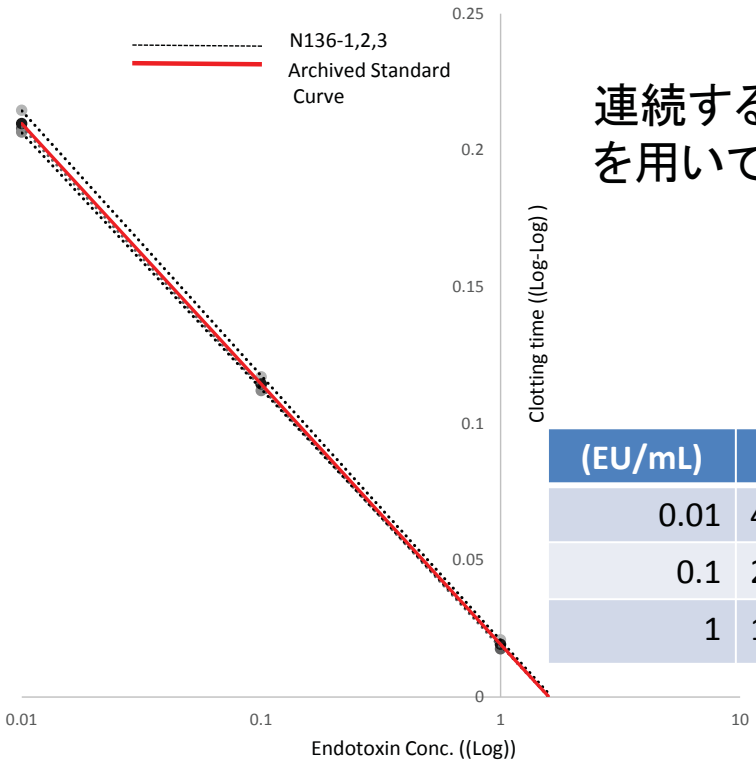
信頼性・経済性を両立したPET向けエンドトキシン新法が必要

保存検量線を使用できないか？

検量線保存利用の妥当性検討

保存検量線を使用した場合に得られるエンドトキシン濃度について、真値からの乖離の程度を各再現性確認条件の下で調査し、検量線の保存利用の妥当性を検討した。

エンドトキシン検量線と作成した保存検量線例

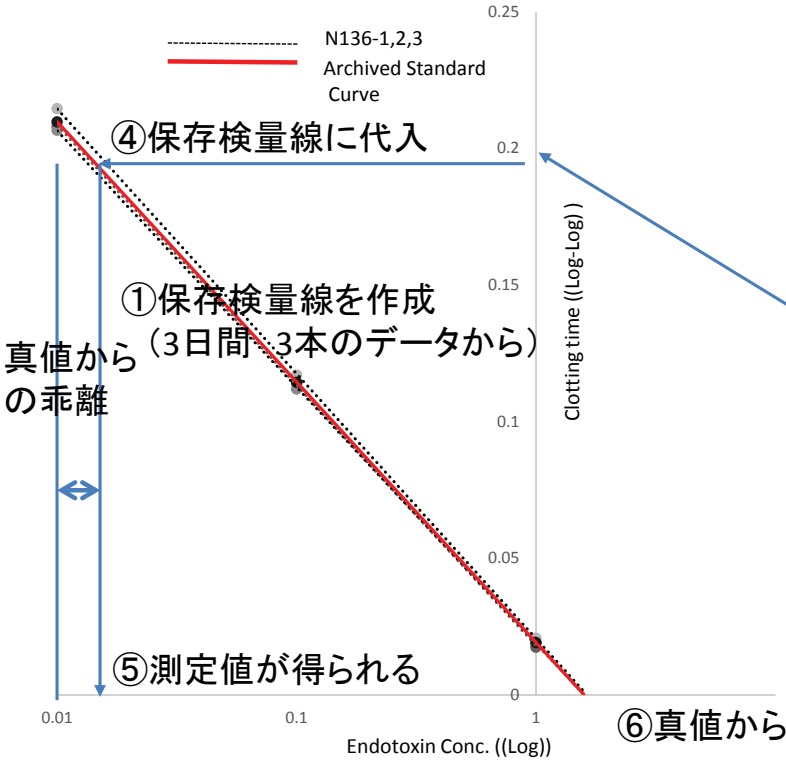


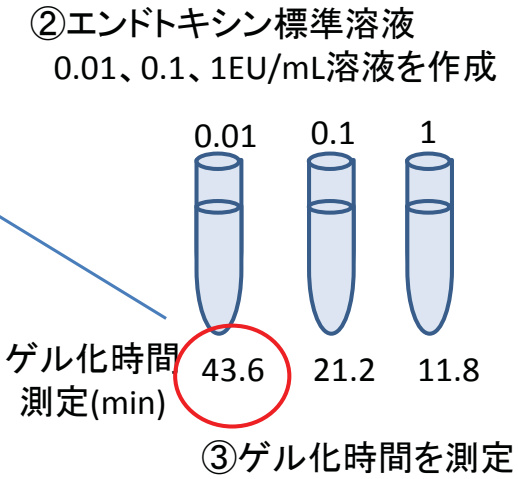
連続する3日の3本の検量線データを用いて、1本の保存検量線を作成

(EU/mL)	N136-1		N136-2		N136-3	
0.01	42.4	40.0	44.6	42.6	40.8	40.6
0.1	20.0	20.0	20.6	20.2	19.6	19.8
1	11.0	11.0	11.2	11.2	11.2	11.0

Clotting Time(min)

保存検量線の妥当性の検討方法



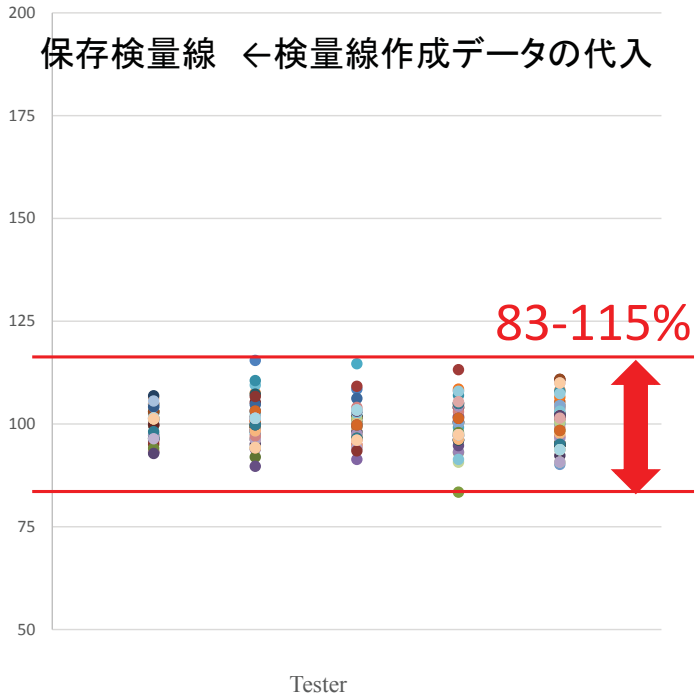


⑥真値からの乖離で評価

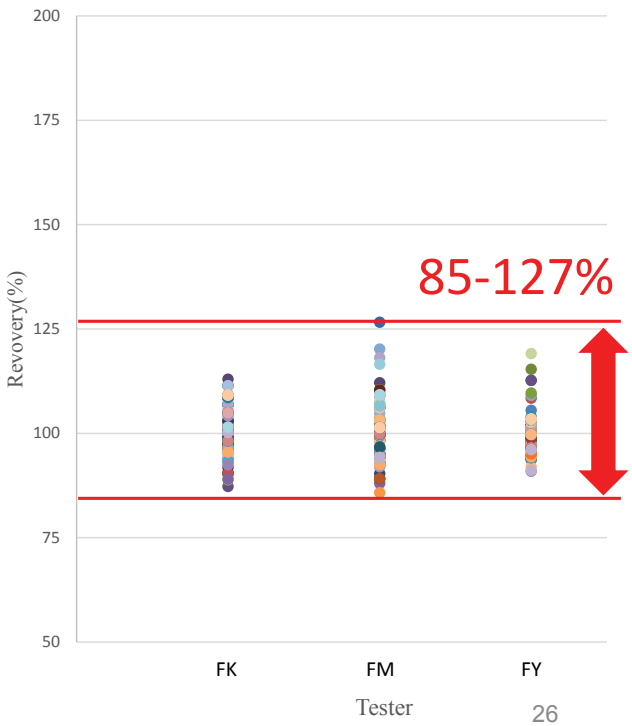
$$\text{回収率} = \frac{\text{検量線により得られた濃度}}{\text{標準溶液の濃度（真値）}} \times 100(\%)$$

保存検量線から得られたエンドトキシン測定値の真値からの乖離１

（１）保存検量線データの自己代入で得られた測定値と真値との乖離

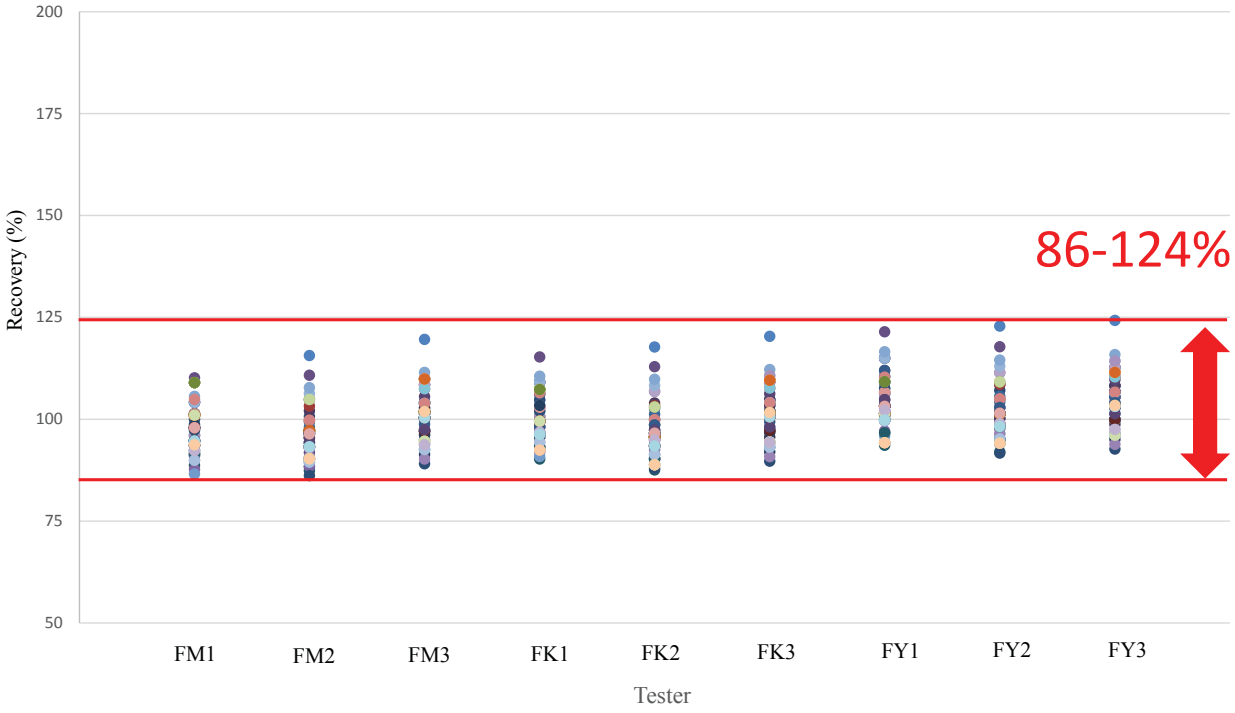


（２）保存検量線 ← 同日データの代入



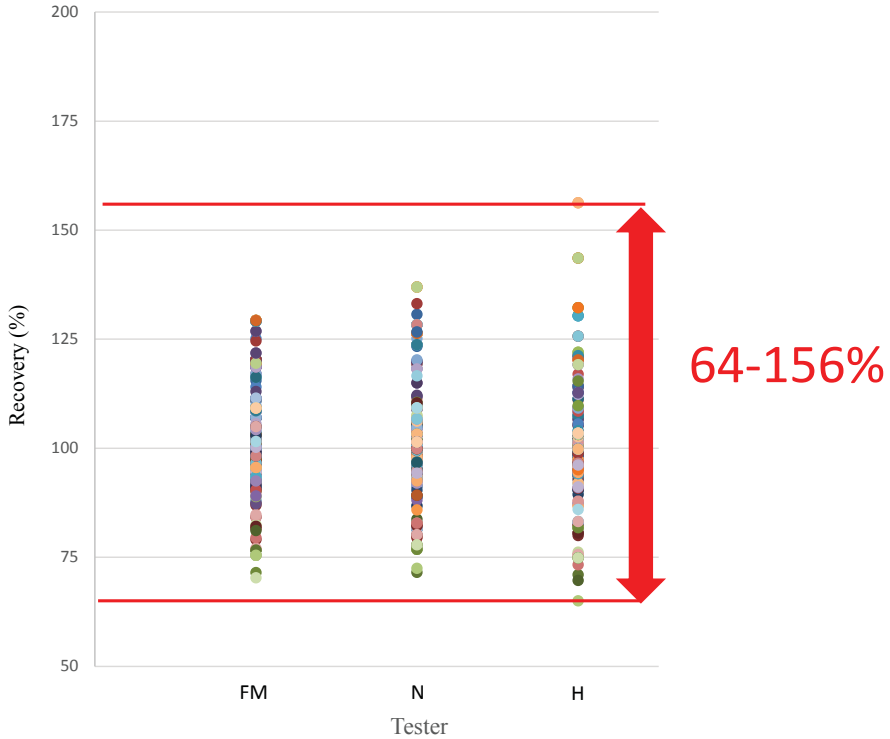
保存検量線から得られたエンドトキシン測定値の真値からの乖離2

（3）保存検量線　←　別日データ代入



保存検量線から得られたエンドトキシン測定値の真値からの乖離3

（4）保存検量線　←　別ロットライセートのデータの代入



保存検量線から得られたエンドトキシン測定値の真値からの乖離4

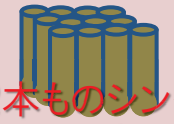
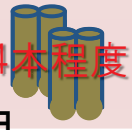
(4)他の施設の保存検量線 ← 同ロットライセートのデータの代入

Table 1-b. Result of the recovery test of the standard solution at substitution in archived standard curves prepared in other facilities.

Lysate Lot	Endotoxin Conc. (EU/mL)	Recovery rate (%)
132	0.01	88 – 121
	0.1	89 – 110
	1	89 – 116
136	0.01	88 – 125
	0.1	88 – 114
	1	88 – 114
137	0.01	86 – 109
	0.1	89 – 110
	1	87 – 124

86–125%

エンドトキシン試験：データの信頼性と経済性

試験法	検量線	反応干渉因子試験	必要なライセート本数
日本薬局方準拠法 検量線：(3濃度 n=2) 検量線中点濃度+PET薬剤(n= 2) エンドトキシン試験用水(n= 2) PET薬剤(n= 2)	○	○	 12本ものシングルテストが必要
多くのPET施設 実施方法 検量線：なし 検量線中点濃度+PET薬剤：なし エンドトキシン試験用水：なし PET薬剤(n= 2)	定量できない ✕	試験条件確認なし ✕	 2本で経済的だが信頼性低い
	検量線を毎日作成しない		
信頼性・経済性を両立したエンドトキシン新法のご提案	保存	○	 4本程度

自施設で作成 または 放医研提示を使用

放医研参考提示保存検量線を利用したエンドトキシン試験を実施するために

1. エンドトキシン簡便法実習受講および検量線使用登録をして下さい。

実習内容

保存検量線作成のデモンストレーション受講
↓
保存検量線使用時のプロトコル作成受講
↓
サンプル測定実習

2. 使用する検量線が作成されたライセートと同じLot番号のライセートを購入・使用して下さい。

3. 毎測定時、下記の条件を満たすとき、試験成立とする。
PC＝75～133%　　PPC＝50～200%

保存検量線の利用条件

- ライセート試薬のロットごとに保存検量線を作成する
- 保存検量線の妥当性を示す
  （例えば相関係数の絶対値を規定するなど）

- 測定操作はプロトコルに厳密に従って行う
- 毎回の測定条件の妥当性を示す
  （例えばＰＣの回収率を規定するなど）

検量線作成方法の説明（1）

保存検量線作成方法のデモンストレーション

＜使用試薬＞
リムルスES-Ⅱシングルテストワコー

＜標準品＞
Control Standard Endotoxin

＜試験用水＞
大塚注射用水

＜使用器材＞
・リムルステストチューブ-Sアルミキャップ付
・ピペット
・バイオクリーンチップワコー1000Ⅱ
・バイオクリーンチップワコーエクステンドSⅡ
・タッチミキサー
・トキシノメーターET-6000

検量線作成方法の説明（2）

保存検量線作成方法のデモンストレーション

1．CSE溶解
CSEの表示力価を参照して終濃度が1000 EU /mLとなるように
バイオクリーンチップでエンドトキシン試験用水を加え、
再びゴム栓をして数回転倒撹拌した後、
タッチミキサーで2分間激しく撹拌する。
溶解後はパラフィルムを巻いて2-10℃で冷蔵保存する。

例）2,400/vialの場合、2.4mLの試験用水を加え1000EU/mLに調製する。

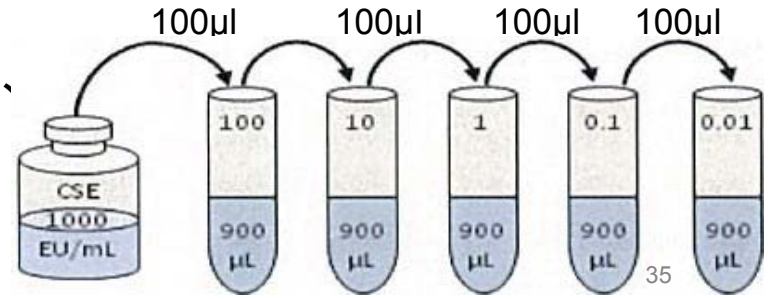
検量線作成方法の説明（3）

保存検量線作成方法のデモンストレーション

2．エンドトキシン標準溶液の希釈
　希釈は室温（10-30℃）で行う。
(ア) リムルステストチューブSを試験管立てに6本並べ、
　目的濃度を記す。1 本は陰性コントロール用とする。

(イ) 各チューブに注射用水を1000μL用ピペットで、900μLずつ分注する。

(ウ) 1．で調製したCSE溶液 (1000 EU /mL)を室温に戻し、
　タッチミキサーで1分間激しく撹拌してから
　バイオクリーンチップエクステンドで100μLを2回洗い込みしてから
　測り取り、100 EU/mLのチューブに加える。
　払い出し時のピペット押し出し操作は1 回とする。
　使用したチップは廃棄する。
　希釈したエンドトキシン溶液は、
　使用まで室温保存する。
　使用期限は当日限りとする。



検量線作成方法の説明（4）

保存検量線作成方法のデモンストレーション

(エ) アルミキャップをしてタッチミキサーで30秒間撹拌を行う。
　この時、内容液をアルミキャップに接触させないこと。

(オ) 以降、新しいチップを取り付け、
　100EU/mLから順次、0.01EU/mLまで繰り返し希釈を行う。
　チップは毎回必ず交換すること

希釈したエンドトキシン溶液は、使用まで室温保存する。
使用期限は当日限りとする。

エンドトキシン溶液 濃度 EU/mL	標品量 μL	注射用水 μL	目的濃度 EU/mL
1000 (CSE)	100	900	100
100	100	900	10
10	100	900	1
1	100	900	0.1
0.1	100	900	0.01

検量線作成方法の説明（5）

保存検量線作成方法のデモンストレーション

3. トキシノメーターによる測定

(ア) 測定開始の20分以上前に機器の電源を入れておく。
測定時間は60分に設定する。

(イ) リムルスES-Ⅱシングルテストワコーのライセート試薬を7 本、
冷蔵庫から取り出して室温に戻す（20分程度）。

(ウ) エンドトキシン試験用水からバイオクリーンチップエクステンドを
使用して200μL を2回洗い込みしてから測り取り、
ライセート試薬に加える（この操作は約2秒で行う）
ただちに約5秒間撹拌し（泡がないことを確認）、一連の操作開始から
合計10秒後にトキシノメーターにセットし、ゲル化時間の測定を開始する。

(エ) 2. で希釈したエンドトキシン溶液のうち、0.01 EU /mLを
20秒撹拌した後、バイオクリーンチップエクステンドを使用して
200μLを2回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加え、
(ウ) と同様にしてトキシノメーターで測定する。
以上の操作を2回繰り返し、n=2の測定を実施する。

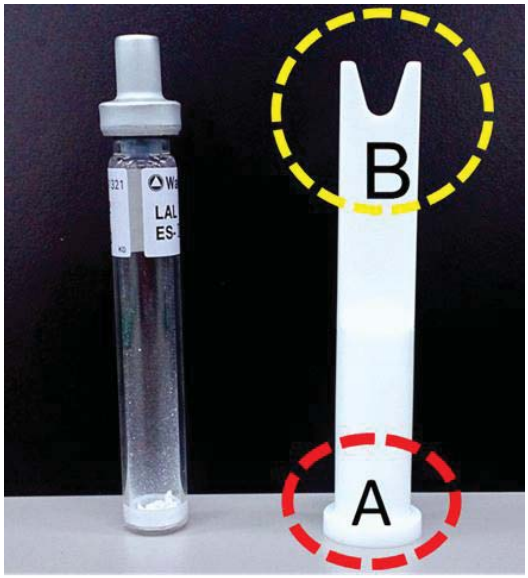
試薬の取り扱い方法（1）

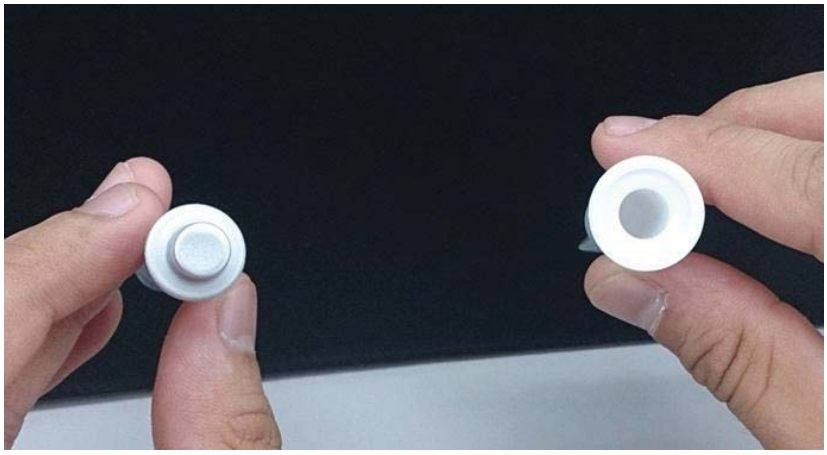
・試験管を取り扱う際は親指、
人差し指、中指の三本でしっかり持つ。

・試験管の下方は握らないようにする。
※機器にセットした際、LED光路となるため、
汚れ等により、測定結果に影響を及ぼす可
能性がある。

汚れた場合、クリーンルーム用ワイパーで
汚れ部分を拭き取ってください。

試薬の取り扱い方法（2）





シングルタイプの試薬にはアルミキャップと
ゴム栓を外すオープナーが入っています。

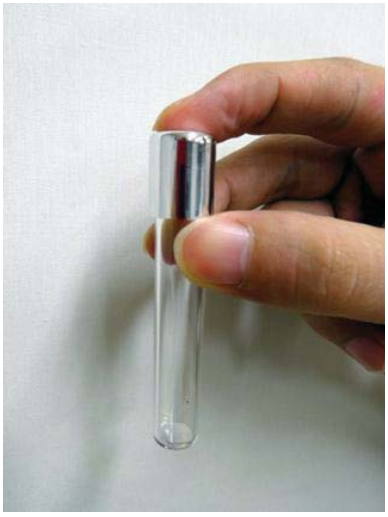
試薬の取り扱い方法（3）

凸型のアルミキャップにオープナーのA部分を被せ、くの字に折り、
円の外周を描くように押し回しながら、アルミキャップのみ外します。

試薬の取り扱い方法（４）

ゴム栓と試験管の隙間に、オープナーのB部分を差込み、ゆっくり空け、
ゴム栓を外したら、アルミキャップですぐさま蓋をする。
※試験管にライセート試薬が含まれており、試験管内が陰圧のため、
勢いよく開封すると粉が舞う危険があります。

測定サンプル添加時の注意点

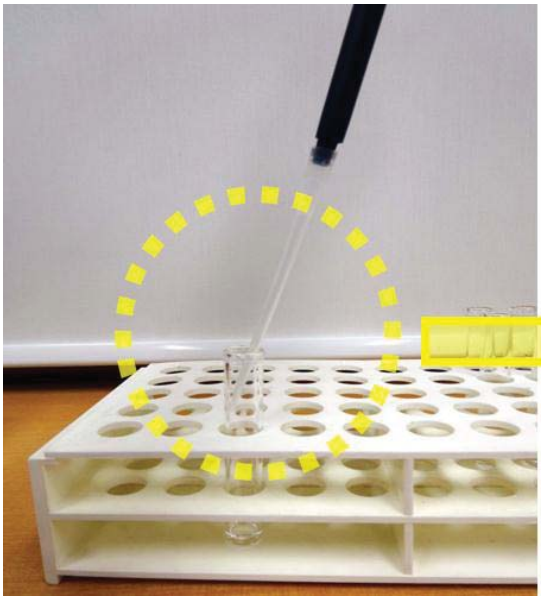


タッチミキサー時の試験管の持ち方

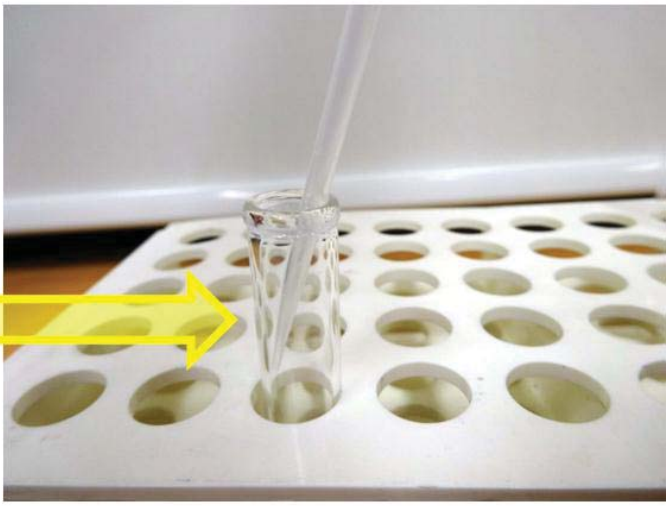
親指、中指で試験管を持ち、
人差し指でアルミキャップを押える。

ピペットは200μL用を使用し、分注量を200に設定する。

測定サンプル添加の一連操作
0拍目



0拍目

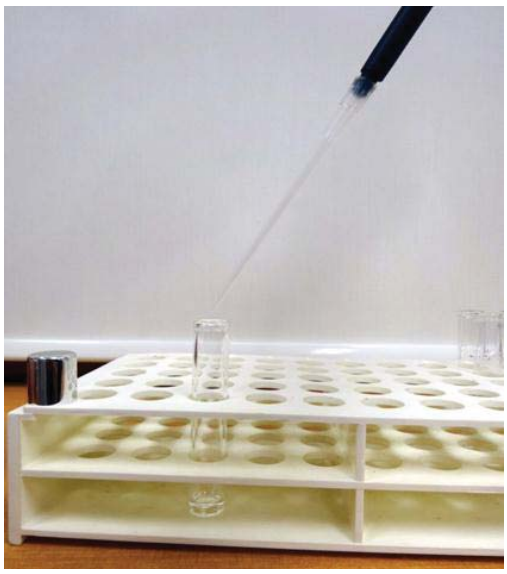


0拍目

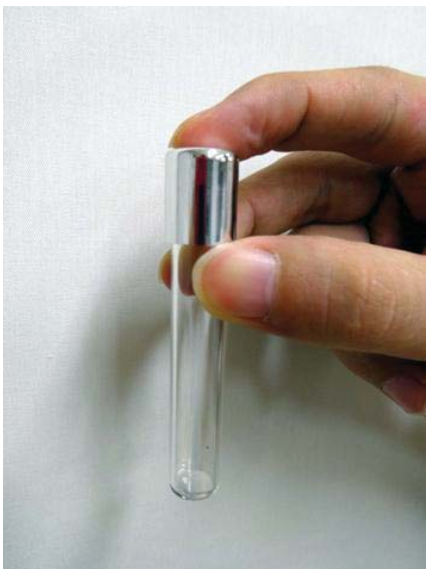
【メトロノーム　0拍目】

サンプルを試験管に吐き出す。
※試験管を手で持って行ったほうが次の操作に移りやすい。

測定サンプル添加の一連操作
1拍～2拍目



1拍目



2拍目

【メトロノーム　　1拍～2拍目】

ピペットを抜き、アルミキャップをかぶせる。

測定サンプル添加の一連操作
3拍～7拍目

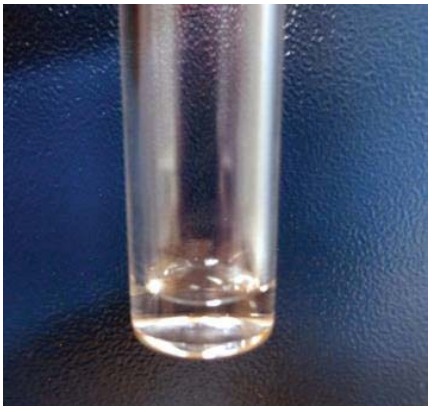
3拍～7拍目

【メトロノーム3拍～7拍目】

タッチミキサーで5秒間撹拌。

測定サンプル添加の一連操作
8拍～9拍目

8拍目



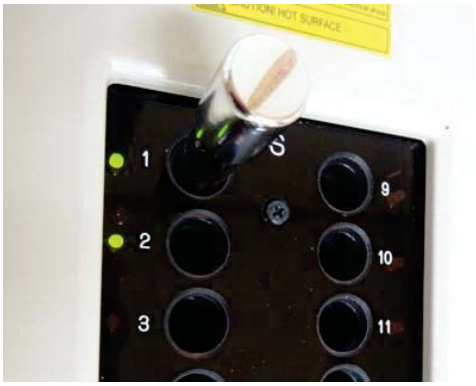
9拍目

【メトロノーム8拍～9拍目】

タッチミキサーから試験をはずし、
気泡がないことを目視確認する。

測定サンプル添加の一連操作
10拍目

10拍目



完了

【メトロノーム10拍目】

10拍目でトキシノメーターにセットする。
（奥まで差込み、セットしたPos. のLEDが点滅から点灯に変わり、次のPos.のLEDが点滅していることを確認する）

※Pos.2 以降、トキシノメーターにセットする際に他の試験管に当たらないように注意する。

エンドトキシン簡便法　実習スケジュール

（講義）　9：35-10:50

◆エンドトキシン測定法の基礎
◆薬局方エンドトキシン試験
◆エンドトキシン簡便法と保存検量線
◆保存検量線作成方法と使用上の注意点

（デモと実習）　10:50-12:35

◆保存検量線作製方法のデモ
◆プロトコル（日常試験の実習）の説明
◆日常試験の実習

（講義）　13:35-13:55

◆トキシノメーターの適格性評価と点検項目

（まとめ）　13:55-14:10

◆測定結果の解説と評価（質疑応答）

デモンストレーションをご覧ください

日常試験の実習

＜目的＞
保存検量線を用いた日常試験の方法を理解する

＜使用試薬＞
リムルスES-Ⅱシングルテストワコー

＜標準品＞
Control Standard Endotoxin

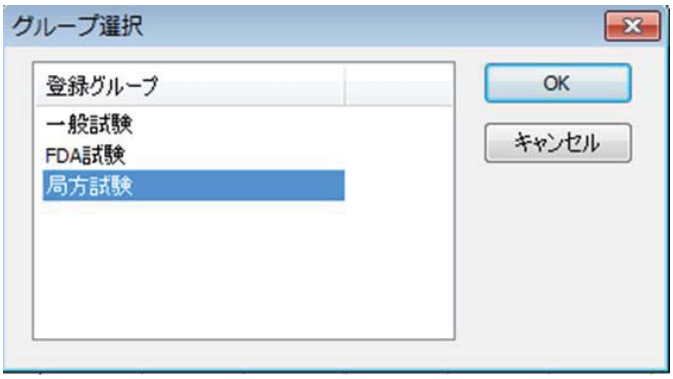
＜試験用水＞
大塚注射用水

＜使用器材＞
・リムルステストチューブ-Sアルミキャップ付
・ピペット
・バイオクリーンチップワコー1000Ⅱ
・バイオクリーンチップワコーエクステンドSⅡ
・タッチミキサー
・トキシノメーターET-6000

検量線情報入力方法（1）

1. 上部メニューの検量線の「編集」をクリック

2. 【局方試験】を選択し「OK」をクリック

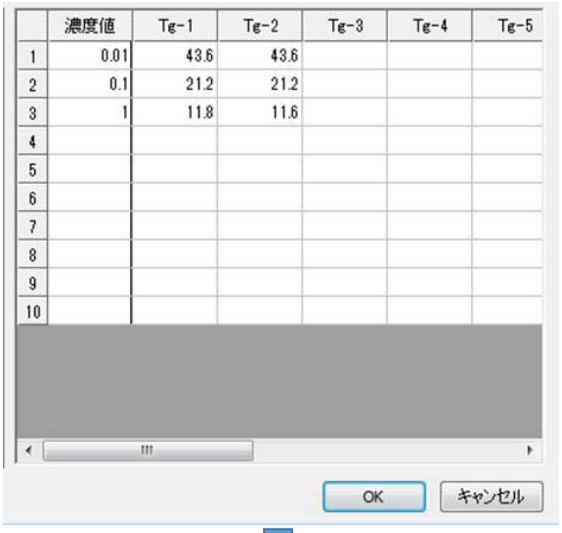


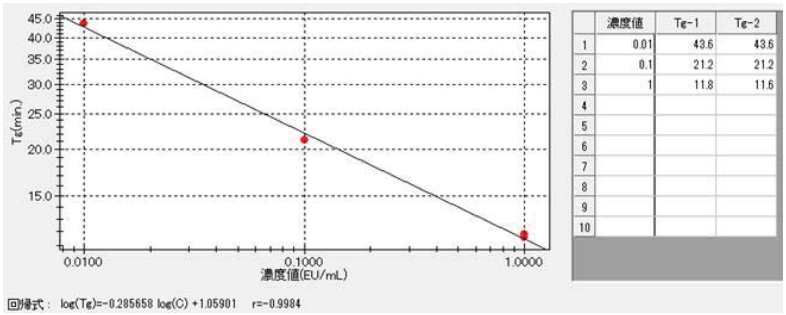
検量線情報入力方法（2）

3. 検量線情報を入力し「OK」をクリック

検量線情報入力方法（3）

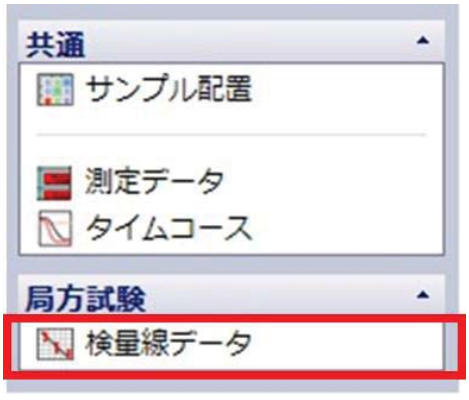
入力例





検量線保存方法（1）

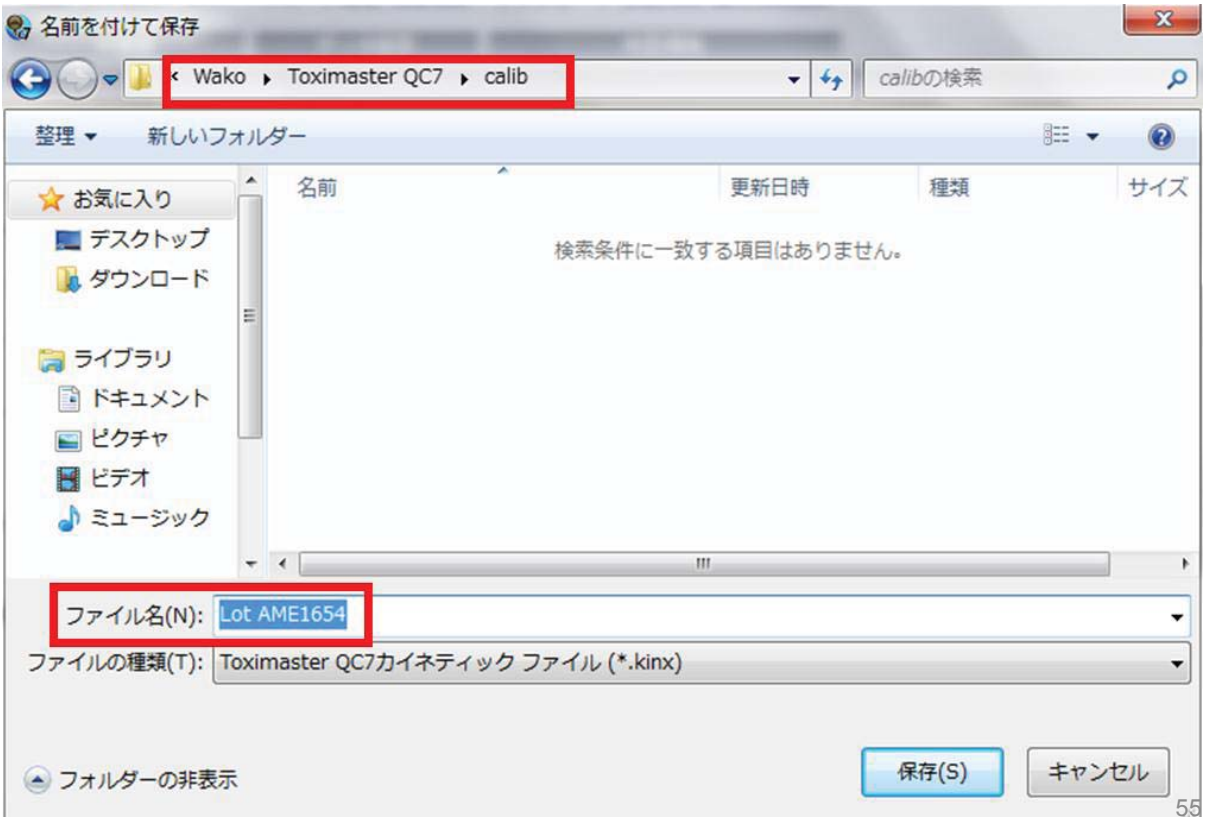
1. 画面左上にある「検量線データ」をクリックする。



2. 画面上部にある検量線の「保存」をクリックする。

検量線保存方法（2）

3. 検量線の保存先を確認し、ファイル名（任意）を入力し「保存」をクリックする。

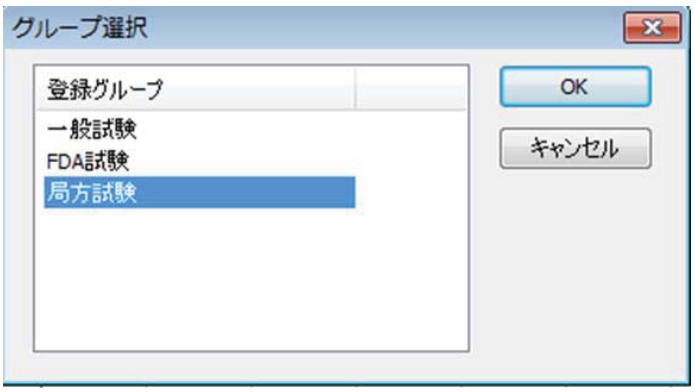


55

検量線読み込み方法（1）

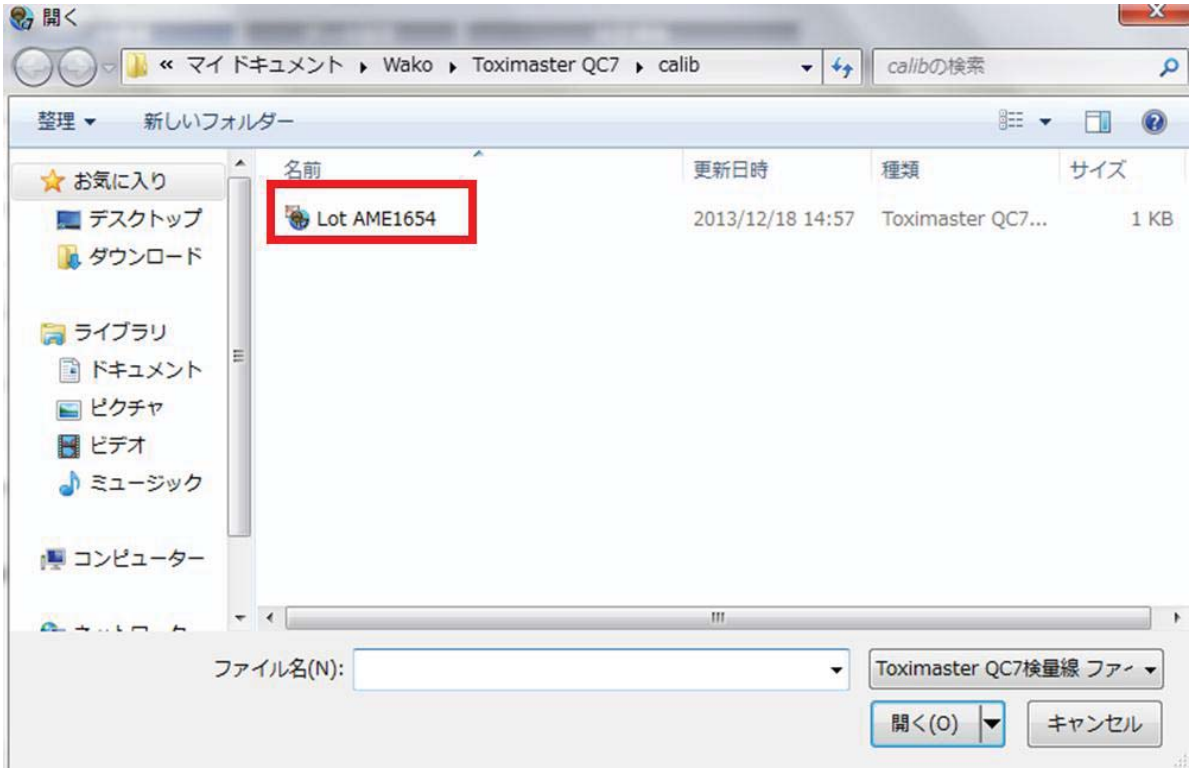
1. 画面上部にある検量線の「読み込み」をクリックする。

2. 【局方試験】を選択し「OK」をクリックする。



検量線読み込み方法（2）

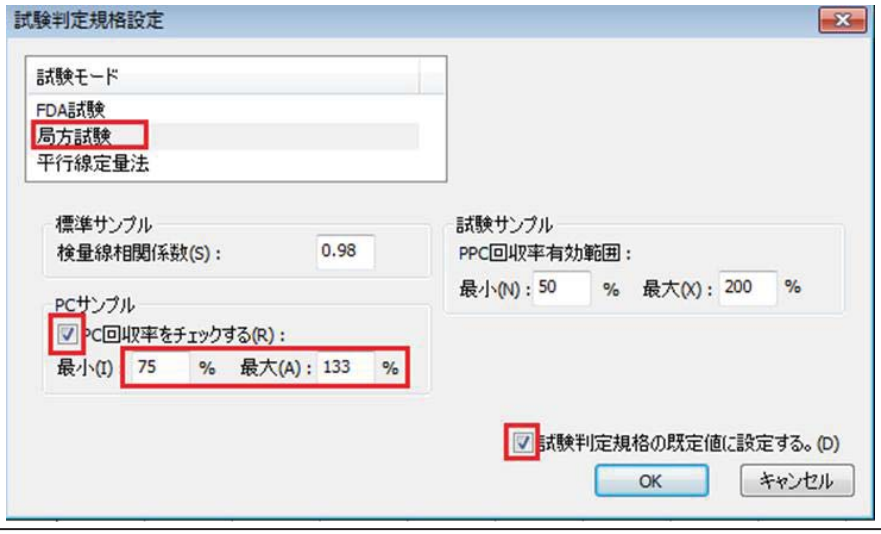
3. 読み込む検量線ファイルを選択し「開く」をクリックする。



試験結果判定規格確認方法

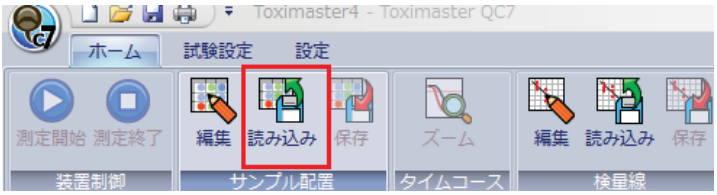
1. 画面上部にある判定規格の「試験結果」をクリックする。

2. 【局方試験】を選択し下の表示画面と同様であることを確認し「OK」をクリックする。
※異なる場合は、下の表示画面になるように設定する。

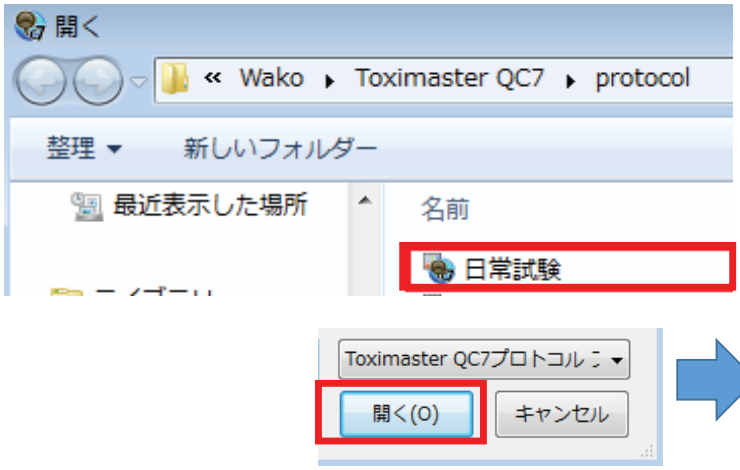


プロトコル読み込み方法

1. 画面上部にあるサンプル配置の「読み込み」をクリックする。



2. 【日常試験】を選択し「開く」をクリックする。



実習プロトコル説明（1）

日常試験の実習

1. トキシノメーターとライセート試薬の準備

(ア) 測定開始の20分以上前に機器の電源を入れておく。
保存検量線のデータを手入力する。
測定時間は、保存検量線データの濃度0.01 EU/mLの
最長ゲル化時間に設定する。

(イ) リムルスES-Ⅱシングルテストワコーのライセート試薬を4 本、
冷蔵庫から取り出して室温に戻す（20分程度）。

実習プロトコル説明（2）

日常試験の実習

2. エンドトキシン標準溶液の希釈

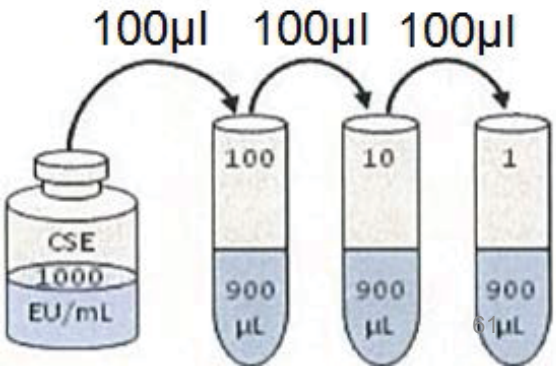
(ア) リムルステストチューブSを試験管立てに3本並べ、下図に従って目的濃度を記す。

(イ) 各チューブに注射用水を1000μL用ピペットで、900μLずつ分注する。

(ウ) CSE溶液 (1000 EU /mL)を室温に戻し、ボルテックスで1分間激しく撹拌する。バイオクリーンチップエクステンドで100μLを2回洗い込みしてから測り取り、100 EU/mLのチューブに加える。
払い出し時のピペット押し出し操作は1 回とする。
使用したチップは廃棄する。

(エ) アルミキャップをしてタッチミキサーで30秒間撹拌を行う。
この時、内容液をアルミキャップに接触させないこと。

(オ) 以降、新しいピペットチップを取り付け、100EU/mLから順次、1EU/mLまで繰り返し希釈を行う。



実習プロトコル説明（3）

日常試験の実習

3. PC、PPC、サンプルの調製

(ア) リムルステストチューブSを試験管立てに3本並べ、1から3まで番号を記す。

(イ) 下表に従って、各チューブに注射用水、CSE溶液 (1 EU/mLを20秒攪拌) 、PET薬剤（FDG) を加える。

試験管番号	名称	注射用水	CSE 溶液(1 EU/mL)	FDG
1	PC	0.9 mL	0.1 mL	—
2	PPC	**0.8 mL**	0.1 mL	0.1 mL
3	サンプル	0.9 mL	—	0.1 mL

実習プロトコル説明（4）

日常試験の実習

4. トキシノメーターによる測定

(ア) 3で調製したPCを20秒撹拌した後、バイオクリーンチップエクステンドを使用して200μL を2回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加える（この操作は約2秒で行う）ただちに約5秒間撹拌し（泡がないことを確認）、一連の操作開始から合計10秒後にトキシノメーターにセットし、ゲル化時間の測定を開始する。

(イ) 同じく3で調製したPPCを20秒撹拌した後、バイオクリーンチップエクステンドを使用して200μLを2回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加え、(ア) と同様にしてトキシノメーターで測定する。

(ウ) 同じく3で調製したサンプルを20秒撹拌した後、バイオクリーンチップエクステンドを使用して200μLを2回洗い込みしてから測り取り、ライセート試薬に加え、(ア) と同様にしてトキシノメーターで測定する。以上の操作を2回繰り返し、n=2の測定を実施する。

エンドトキシン簡便法　実習スケジュール

（講義）　9：35-10:50

◆エンドトキシン測定法の基礎

◆薬局方エンドトキシン試験

◆エンドトキシン簡便法と保存検量線

◆保存検量線作成方法と使用上の注意点

（デモと実習）　10:50-12:35

◆保存検量線作製方法のデモ

◆プロトコル（日常試験の実習）の説明

◆日常試験の実習

（講義）　13:35-13:55

◆トキシノメーターの適格性評価と点検項目

（まとめ）　13:55-14:10

◆測定結果の解説と評価（質疑応答）

測定システムの適格性確認（分析機器のバリデーション）

設計時適格性確認（DQ, Design Qualification）

分析機器の機能・性能仕様、機器メーカーへの要求事項を定める評価

据付時適格性確認（ＩＱ, Installation Qualification）

装置が正しく据え付けられたかどうかを確認

※新規の納入時、再据付時にも行う。

稼動性能適格性確認（ＯＱ, Operational Qualification）

装置に期待される機能、性能が得られていることを確認

※新規の納入時、定期点検時、修理後にも行う。

稼動時適格性確認（ＰＱ, Performance Qualification）

使用時に期待される結果が得られていることを確認

測定システムの適格性確認（分析機器のバリデーション）

分析機器の適格性評価

設計時適格性確認（DQ）の要求を満たす装置が正しく据え付けられたことを確認するのがIQ、DQの要求を満たす性能が得られていることを確認するのがOQ。

実試料による分析時に期待される結果が得られていることを確認するのがPQ。

適格性評価を実施しなければ・・・

機器が目的とする用途に適合していることを証明することが出来ない。且つ、分析データの妥当性を示すことが出来ない。

測定システムの適格性確認
（分析機器のバリデーション）

バリデーションの方法

文書化された手順に従って検証し、期待される結果が得られているかを確認し、その結果を記録すること。

技術者の適格性について

バリデーションやメンテナンスを実施するにあたり、

①バリデーションの目的・手順・確認方法・結果の取扱を正しく理解する必要がある。

②機器の十分な知識と理解、正しい技能を修得する必要がある。

教育トレーニングを設けており、適格性があるとみなした場合に「メンテナンス技術者認定書」を発行。バリデーションの方法が変更された場合は、更新教育を実施する。

トキシノメーター
バリデーション・サポート・サービス

納品時バリデーション

IQ / Standard OQサービス

納品時IQOQ ¥200,000

・設置場所確認 ・電源電圧確認 ・環境温度確認 ・外観検査 ・接続確認
・初期動作確認 ・システム構成確認 ・トレーサビリティー証明書（電圧計）
・IQドキュメント（計画書、実施手順書、実施報告書）
・Standard OQサービス（内容の詳細は下段参照）

稼動性能確認、機能点検

Standard OQサービス

1システム ¥150,000
2システム ¥250,000※1

・外観確認 ・初期動作確認 ・タッチパネル/スイッチ動作確認
・光学系性能確認 ・温度制御機能確認 ・タイマー精度確認
・トレーサビリティー証明書（温度計、ストップウォッチ）
・OQドキュメント（計画書、実施手順書、実施報告書）

トキシノメーターET-6000の Standard OQ 項目

ID	テスト名	内容説明
Standard OQ		
01	外観・設置環境確認	外観に異常のないこと、設置環境が装置の使用に適していることを確認する。必要に応じ、清掃を実施する。
02	電源 ON 時動作確認	電源 ON 時の動作に異常のないことを確認する。
03	装置基本動作確認	装置の基本動作に異常がないことを確認する。 ・温度制御、　・光量チェック、 ・トキシノメーター ET-6000 動作　・タイマー精度
		装置の基本動作に異常がないことを確認する。 ・タイムコース　・プリンタ出力
04	演算処理機能確認	装置の演算処理機能に異常がないことを確認する。

※本OQに関わる全ての文書は定期的にチェックが行われるため、将来にわたり常に改訂される可能性がある。なお、OQ計画書、OQ手順書およびOQ実施報告書の改訂時の移行期間として、改訂の直前の版は改訂版の発効日の翌月同日まで運用できる。

温度制御の確認

- 周囲温度が15-30℃であること
- 画面表示の設定温度が37.0℃であること

水入り反応試験管をポジション1, 4, 7, 10, 13, 16にセットし、温度センサで測定、温度補正値を記録する。

- 各ポジションの温度センサの表示温度が1分間以上、±0.1℃以内で安定していること
- 温度補正値が37.0±0.8℃
- MAXとMinの温度差が0.6℃以内

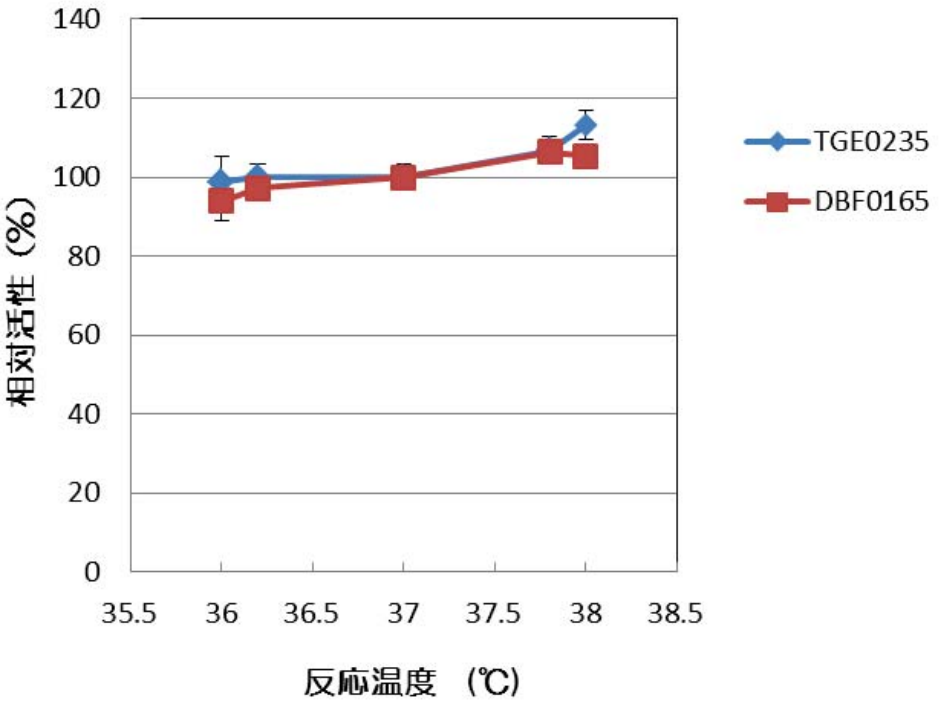
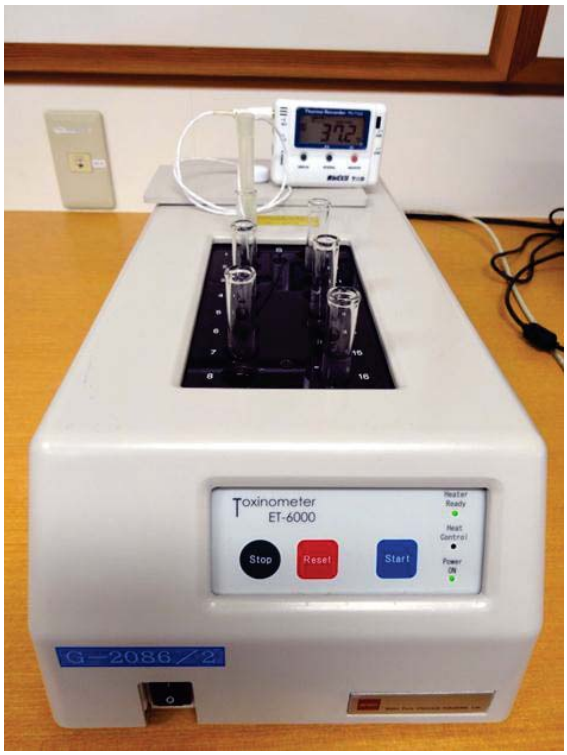


図　ES2 Single 反応温度と相対活性

温度制御の確認方法



水入り反応試験管をポジション1, 4, 7, 10, 13, 16にセットし、校正済み温度センサで測定する。

光量チェック

全ポジションについて、試験管無しの光量と、装置付属の試験管で水光量（蒸留水を2mL入れた試験管をセットした場合の光量）を測定する。

- 試験管無しの光量測定値が、製造時光量の-50%以上+20%以下
- 水光量の測定値が、製造時光量の-50%以上+20%以下

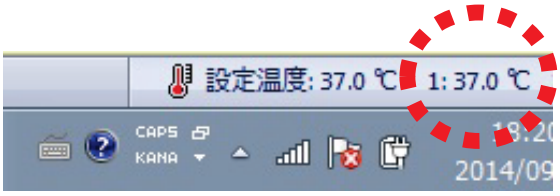
光量チェック手順（1）

専用試験管に2mLの蒸留水もしくはイオン交換水を分注する。
装置の電源を入れて30分以上ウォーミングアップさせる。
その際、水を入れた専用試験管も加温しておく。
※試験管の下部は光路になるので汚さないように注意する。

光量チェック手順（2）

トキシマスターQC7 を起動する。
ウォーミングアップが終わったら、設定温度付近になっていることを確認して、加温しておいた専用試験管を抜く。

クリック！



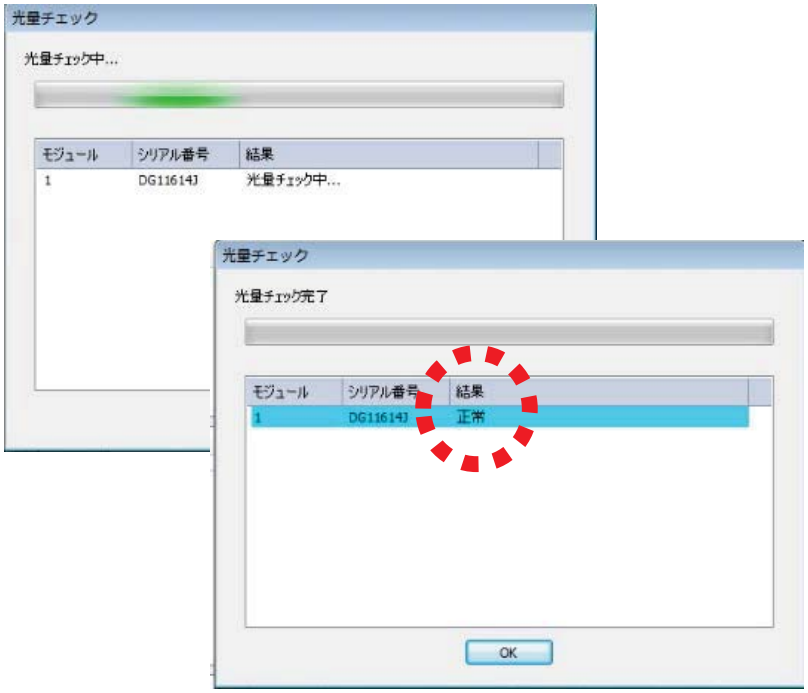
【測定開始】を選択する。

光量チェック手順（3）

測定時間を60分に設定する。
【測定開始前に光量チェックを実施】にチェックをいれて、【測定開始】を選択する。

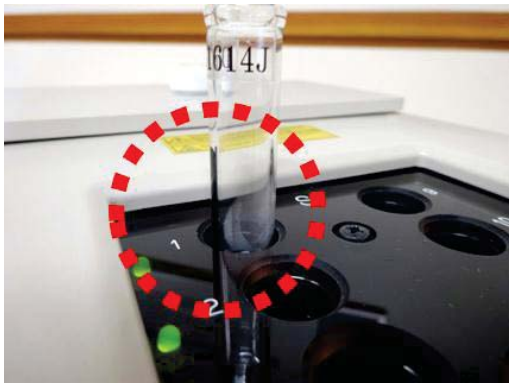
※自動光量チェックの際は、
測光部カバーをすること。

光量チェック手順（4）

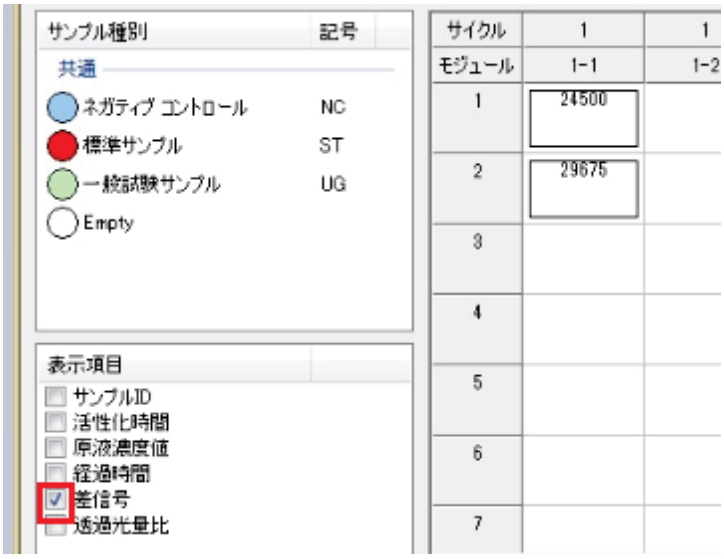


自動的に光量チェックが開始され、完了したら『正常』と表示される。
1ポジション目の**LEDが緑色に点滅**していることを確認する。

光量チェック手順（5）



試験管のマーカーを光源位置（Pos.No側）に合わせる。



試験管をPos.1に挿入する。トキシマスターQC7で差信号を表示する。
差信号は表示が2回変更した値を100で割った数字を記録する。
小数点以下は切り捨てる。（例）29675⇒296
この作業を、順次、16ポジション繰り返し行い、測定を終了する。

光量チェック手順（6）

再度、トキシマスターQC7で【測定開始】を選択する。
全てのポジションをスタートキーで測定開始する。
トキシマスターQC7で差信号を表示する。
差信号は表示が2回変更した値を100で割った数字を記録する。
（16ポジション全て） 小数点以下は切り捨てる。（例）29675⇒296

光量チェック手順（参照）

ET-6000 取扱説明書　10. 保守・点検　10.1. 光量チェック

光量は半年に1回程度定期的にチェックしてください。設置時の 50%以下に減少、または、20%以上増加した場合は、弊社までご連絡ください。

① 付属の光量チェック用試験管に蒸留水またはイオン交換水 2.0mL を入れ、測定ポジション No.1 に挿入します。

※試験管の底から1cm はトキシノメーターの測光部分に当たりますので、汚さないようにしてください。汚れている場合は、クリーンルーム用ワイパーなどで汚れをふき取って下さい。

※試験管の測光部分に泡がある場合は試験管を指でパチンとはじいて泡を取り除いてください。

② ET-6000 の電源を入れ ET-6000 用ソフトウェアを起動し、30 分以上ウォーミングアップします。試験管も一緒に加温します。

③　ET-6000 用ソフトウェアで装置温度が設定温度に到達したことを確認します。
④　ET-6000 用ソフトウェアで測定時間を 60 分に設定します。一旦試験管を抜き、測定を開始し、光量チェックが終了するのを待ちます。
⑤　光量チェックが終了したら、試験管を戻し、ET-6000 の Start キーを押して 16 ポジションすべて測定をスタートします。
⑥　ET-6000 用ソフトウェアで差信号を表示します。
⑦　測定ポジション全体を紙箱（大きさ:（約）110(W)×180（D)×50（H)(mm)）などで覆います。
⑧　測定ポジション No.1 に表示される差信号値を光量チェック表の No.1 の「水試験管の光量」欄に記入します。光量チェック表は「11.2.光量チェック表」を参照してください。
※差信号を記録するときは、表示値を 100 で割って小数点以下を切り捨てた値を記録してください。
例 1:差信号が 23187 の場合　→　231 を記録する
例 2:差信号が 9825 の場合　→　98 を記録する

⑨　試験管を次のポジションに移動し、そのポジションの差信号値を光量チェック表の「水試験管の光量」欄に記入します。この操作を繰り返し、全ポジションの差信号値を光量チェック表に記入します。
※画面の表示値は 12 秒ごとに変わります。試験管を挿入したあと約 12 秒程度待つと差信号値が変わるので、その値を記録してください。
※試験管を移動させるときだけ箱を外し、差信号値の測定中は箱をかぶせておいてください。
※差信号を記録するときは、表示値を 100 で割って小数点以下を切り捨てた値を記録してください。
例 1:差信号が 23187 の場合　→　231 を記録する
例 2:差信号が 9825 の場合　→　98 を記録する
⑩　試験管を抜き取り、全ポジションが空であることを確認し、箱を被せます。
⑪　全ポジションの差信号値を「11.2.光量チェック表」の「試験管なしの光量」欄に記入します。
⑫　ET-6000 用ソフトウェアでデータを保存します。

保存した記録データは光量チェックの記録データとして記入済みのチェック表とともに保管されることをおすすめします。

⑬　出荷時の光量値と比較し、規格を外れるときは、正しく測定できない可能性があります。弊社までご連絡ください。

規格	出荷時の光量値の－50%以上かつ＋20%以下の範囲であること

エンドトキシン簡便法　実習スケジュール

（講義）　9：35-10:50

◆エンドトキシン測定法の基礎
◆薬局方エンドトキシン試験
◆エンドトキシン簡便法と保存検量線
◆保存検量線作成方法と使用上の注意点

（デモと実習）　10:50-12:35

◆保存検量線作製方法のデモ
◆プロトコル（日常試験の実習）の説明
◆日常試験の実習

（講義）　13:35-13:55

◆トキシノメーターの適格性評価と点検項目

（まとめ）　13:55-14:10

◆測定結果の解説と評価（質疑応答）

測定結果の解説と評価（１）

結果の判定

(ア) 保存検量線を用いて算出したPCのエンドトキシン濃度が、
0.075 EU/mL以上かつ0.133 EU/mL以下であることを確認する。

(イ) 保存検量線を用いて算出したPPCのエンドトキシン濃度から
サンプルのエンドトキシン濃度を差し引いた値が、
0.050 EU/mL以上かつ0.20 EU/mL以下であることを確認する。

(ウ) （ア）と（イ）が確認できれば、測定は有効である。
サンプルのエンドトキシン濃度を保存検量線を用いて算出し、
規格内かどうかを判定する。

（例えば、サンプルのエンドトキシン濃度がA EU/mLとなった場合、
薬剤原液のエンドトキシン濃度は、A×希釈倍数となる。
これが規 格値未満であるかどうかを判定する。）

測定結果の解説と評価（２）

結果の判定（続き）**（本日は実施しない）**

(エ) 保存検量線を用いて算出したPCのエンドトキシン濃度が、
0.075 EU/mL以上かつ0.133 EU/mL以下でなかった時、
以下を確認して再試験する。
⇒CSEの有効期限、保存方法には問題ないか？
⇒CSEの溶解方法や希釈方法は正しいか？
⇒測定操作はプロトコルにのっとっているか？
⇒トキシノメーターの温度、光量は適正か？

(オ) PCのエンドトキシン濃度は0.075 EU/mL以上かつ0.133 EU/mL以下であったが、PPCのエンドトキシン濃度からサンプルのエンドトキシン濃度を差し引いた値が、0.050 EU/mL以上かつ0.20 EU/mL以下でなかった時
⇒サンプルをさらに希釈して再試験する。